



CT/FR 98/02344

CAJU

REC'D	29 NOV 1998
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

## PRIORITY DOCUMENT

~~CERTIFICAT D'UTILITÉ CERTIFICAT D'ADDITION~~

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 OCT. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

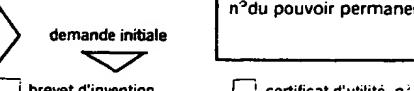
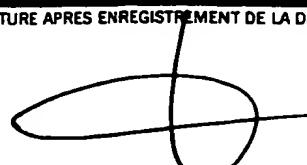
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

— Réservé à l'INP

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

### Confirmation d'un dépôt par télécopie

**Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales**

DATE DE REMISE DES PIÈCES		03 NOV 1997	1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		97 13771	CABINET ORES	
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT		75	6 avenue de Messine 75008 PARIS	
DATE DE DÉPÔT		03 NOV. 1997	n°du pouvoir permanent      références du correspondant BLOCp263/34FR	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle		<input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen  <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° <input type="checkbox"/> différencié <input checked="" type="checkbox"/> immédiat		
Établissement du rapport de recherche		date		
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance		<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	
Titre de l'invention (200 caractères maximum)				
VECTEUR PEPTIDIQUE DE TRANSFECTION, COMPOSITION LE CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS.				
3 DEMANDEUR (S)      n° SIREN		code APE-NAF		
Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination				
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE & CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS				
Forme juridique				
Etablissement public				
Etablissement public				
Nationalité (s) française				
Adresse (s) complète (s)		Pays		
31-33 rue de la Fédération, 75015 PARIS		FRANCE		
&				
3 rue Michel Ange, 75794 PARIS Cédex 16		FRANCE		
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>				
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> oui	<input checked="" type="checkbox"/> non	Si la réponse est non, fournir une désignation séparée
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		<input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois	<input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission	
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTIÉRIEURE				
pays d'origine		numéro	date de dépôt	nature de la demande
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°				
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION		SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI
 Béatrice ORES n° 92-4046				

## DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

## BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR  
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

*9713771*

TITRE DE L'INVENTION : VECTEUR PEPTIDIQUE DE TRANSFECTION, COMPOSITION LE  
CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6 avenue de Messine  
75008 PARIS (FRANCE)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

CHROBOCZEK Jadwiga  
22 cours de la Libération  
38100 GRENOBLE (FRANCE)

FENDER Pascal  
67 avenue Alsace Lorraine, Appt 607  
38000 GRENOBLE (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du mandataire

Le 3 novembre 1997,

*Ston*

Béatrice ORES  
n° 92-4046

La présente invention est relative à un vecteur peptidique de transfection, à une composition contenant ledit vecteur ainsi qu'à leurs applications dans le traitement (médicaments) et la prévention (vaccins) des maladies humaines et animales. Ledit vecteur est notamment apte à dispenser à 5 des cellules cibles convenables, des séquences nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques d'intérêt.

Dans le domaine de la thérapie génique, de nombreuses compositions, utiles pour transfecter efficacement les cellules eucaryotes avec un matériel génétique sélectionné ont été décrites.

10 Il existe essentiellement deux grands types de vecteurs de transfection :

- les vecteurs de transfection naturels, tels que les virus ou les virus modifiés, qui sont efficaces mais qui présentent des limites d'utilisation : non-spécificité tissulaire, nécessité d'obtenir des constructions pour chaque 15 gène d'intérêt et risques potentiels pour l'environnement, qui conduisent à la mise en place d'infrastructures cliniques coûteuses et contraignantes pour le malade et le personnel ;
- des agents non-viraux (vecteurs synthétiques), capables de promouvoir le transfert et l'expression de substances chimiques telles que 20 l'ADN, dans les cellules eucaryotes. Cette dernière stratégie représente une alternative aux vecteurs viraux.

Ces vecteurs synthétiques doivent avoir essentiellement deux fonctions : condenser l'ADN à transfacter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et éventuellement les 25 membranes nucléaires ; de tels vecteurs doivent donc mimer le fonctionnement des virus, pour être efficaces ; toutefois, il apparaît que les différents vecteurs proposés dans l'art antérieur ne présentent pas ces deux fonctions, de manière optimale et peuvent, en outre, selon les cas, être toxiques pour les cellules.

Parmi ces agents non-viraux, on peut tout d'abord citer les polymères cationiques et les lipides cationiques. Les premiers sont généralement constitués de polylysine, alors qu'il existe une grande variété de lipides cationiques (liposomes ou pseudo-liposomes), chacun donnant des efficacités 5 de transfection variable suivant les types cellulaires (DOTMA, etc...).

La partie lipidique qui interagit avec et/ou déstabilise les membranes permet la fusion et l'entrée du complexe ADN/liposome.

Cependant, la transfection d'ADN par les liposomes, bien que moins immunogénique que celle réalisée à l'aide des polymères cationiques, 10 est en fait un procédé relativement inefficace.

Le mécanisme majeur de l'entrée des complexes ADN/liposomes, est, semble-t-il, l'endocytose ; en conséquence, l'ADN transfecté est piégé dans les vésicules intracellulaires et détruit par les enzymes lysosomales.

15 Même si une partie de l'ADN transfecté est libéré dans le cytoplasme par un effet d'action de masse, seulement une petite fraction de cet ADN se retrouve effectivement dans le noyau.

Des agents capables d'augmenter la libération de l'ADN des vésicules endosomiques et son passage dans le noyau peuvent augmenter le 20 taux de transfert génique.

Parmi ces agents, on distingue :

- ceux qui ciblent le complexe vers un autre point d'entrée : le ciblage est obtenu par exemple en couplant des ligands aux polymères de polylysine ; le ciblage peut aussi se faire après l'internalisation, en dirigeant 25 les complexes vers le noyau (Demande Internationale PCT WO 95/31557) et

- ceux qui évitent la dégradation endosomale : pour échapper à la dégradation endosomale, il a été proposé d'incorporer un agent endosomolytique dans le complexe, tel que des particules adénovirales (Demande Internationale PCT WO 93/07283) ou plus récemment des peptides synthé-

tiques à activité endosomolytique, qui augmentent la libération de l'ADN dans le cytoplasme.

Compte tenu de ce qui précède, différents types de complexes ont été proposés ; on peut citer, des complexes associant des liposomes et des 5 peptides, tels que ceux décrits dans :

- la Demande Internationale WO 96/25508, qui décrit des compositions comprenant (i) l'acide nucléique à transfacter, (ii) un agent de transfection, tel qu'un polymère cationique et/ou un lipofectant, (iii) un composé peptidique intervenant au niveau de la condensation de l'acide 10 nucléique, constitué en tout ou partie de motifs peptidiques possédant une majorité d'acides aminés à caractère basique comme la lysine, l'histidine, l'arginine (histones, nucléoline, protamine ou leurs dérivés) et éventuellement (iv) un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique, tel qu'un ligand de type intracellulaire comme une séquence signal 15 de localisation nucléaire (NLS) qui privilégie l'accumulation de l'ADN transfected au sein du noyau et qui peut être associé au composé peptidique pour former un peptide chimère comprenant un fragment de protéine (histone ou protamine ou nucléoline) et une séquence NLS. Toutefois, ce système nécessite la présence d'un polymère cationique et/ou d'un lipofectant, qui ont 20 l'inconvénient d'être toxiques et/ou coûteux.

- la Demande Internationale WO 97/30170 qui décrit également des compositions pour la transfection des cellules eucaryotes, qui comprennent l'acide nucléique à transfacter, au moins un lipide cationique à une concentration suboptimale et au moins un peptide acide (actif sur la 25 membrane), qui déstabilise la membrane endosomique et augmente ainsi l'efficacité de la transfection. Le rapport charge positives/charges négatives est compris entre 0 et 3. Les peptides sélectionnés sont issus du virus de l'influenza, pour induire une rupture effective des endosomes. La présence des lipides est nécessaire, dans cette composition, du fait que le peptide sélectionné ne permet pas le passage de la première membrane cellulaire.

De tels complexes ne permettent donc pas d'éviter les inconvénients liés à l'utilisation de liposomes.

C'est sans doute la raison pour laquelle des complexes ne mettant en oeuvre que des peptides ont été proposés :

5 - la Demande de Brevet européen 0 544 292, qui décrit un complexe de transfection d'acide nucléique qui comprend une protéine de fusion constituée d'un facteur cellulaire (facteur de croissance, antigène viral, toxine, intégrine ou lipoprotéine) et d'un peptide polycationique basique comprenant des résidus arginine et/ou lysine.

10 - la Demande Internationale WO 94/23751, qui décrit un peptide de transfert qui comprend trois parties : (1) un ligand L1 (peptide de 2 à 100 aminoacides, apte à se lier à un site de liaison à la surface des cellules eucaryotes (récepteur membranaire) (exemple : peptide RGD, domaine de liaison des facteurs de croissance, des hormones, des antigènes viraux ou des 15 lipoprotéines ; (2) un ligand L2 similaire à L1 (peptide de 2 à 20 aminoacides), qui se lie à la membrane nucléaire externe des cellules eucaryotes, telle qu'une séquence NLS et (3) un ligand L3 correspondant à un peptide basique (3 à 100 aminoacides) (fragment d'histone H1 ou H2B, par exemple). Les peptides de transfert décrits dans cette Demande ont donc une structure 20 générale ligand d'un récepteur membranaire-ligand de la membrane nucléaire externe-peptide basique. Une telle structure a été proposée afin d'améliorer la spécificité du complexe vis-à-vis de cellules cibles, mais présente une toxicité du même ordre que celle des liposomes ; en outre, il faut adapter la construction en fonction des cellules cibles (présence de récepteurs 25 spécifiques sur les cellules cibles) et

- la Demande internationale WO 95/31557 qui décrit un vecteur de transfection comprenant un peptide synthétique et l'acide nucléique à transfecter. Le peptide synthétique comprend une chaîne polymérique d'aminoacides basiques, de préférence en position C-terminale (10-50 30 aminoacides, tels que lysine, arginine et ornithine), un peptide NLS (6-15

aminoacides, tels que la séquence NLS de l'antigène T de SV40, la séquence NLS de l'antigène T de polyome, la séquence NLS d'adénovirus E1a ou la séquence NLS d'adénovirus E1b, de préférence en position N-terminale et une région charnière d'aminoacides neutres (6-50 aminoacides sélectionnés 5 parmi la glycine, lalanine, la leucine et l'isoleucine), entre la chaîne polymérique et le peptide NLS. La séquence NLS préférée est la séquence de l'antigène T du virus SV40 (petite séquence d'aminoacides basiques : PKKKRKV), qui est efficace dans les cellules de mammifère ou une séquence hydrophobe courte qui contient un ou plusieurs aminoacides basiques 10 (KIPIK). La séquence charnière, comprend 6-26 aminoacides neutres sélectionnés uniquement parmi Gly (G), Ala (A), Leu (L) et Ile (I). Le rapport (en poids) peptide:ADN est compris entre 1:1 et 1:10. Le peptide décrit dans ce document passe difficilement la membrane cellulaire et c'est la raison pour laquelle, il est préconisé, dans cette Demande internationale de traiter les 15 cellules avant la transfection : les cellules sont traitées avec une solution hypertonique, puis avec une solution hypotonique en présence du complexe acide nucléique-peptide. La solution hypertonique peut contenir du PEG (0,3 M-0,6 M) et du saccharose (10-25 %).

Ces différents complexes possèdent la propriété de condenser 20 l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire ; toutefois ils sont loin d'être aussi performants que les vecteurs viraux, notamment en raison d'une condensation insuffisante de l'ADN à transfacter et/ou des difficultés rencontrées par l'ADN transfecté pour sortir de l'endosome sans être dégradé et pour pénétrer dans le noyau cellulaire.

25 Cherchant à mettre au point de nouveaux vecteurs ne présentant pas les inconvénients des vecteurs viraux, les Inventeurs ont mis au point le vecteur décrit dans la Demande Internationale WO 97/18317, qui décrit des compositions comprenant un complexe protéique adénoviral constitué :

A. d'un complexe protéique adénoviral, à savoir :

- soit de 12 pentons, comprenant chacun au moins une fibre et une base de penton, à l'exclusion de tout autre élément constitutif du génome d'un adénovirus, lesquelles fibre(s) et base du penton sont dérivées soit du même adénovirus, soit d'adénovirus différents, lesdits pentons étant liés par les bases de penton et formant une structure en dodécaèdre, stable aux enzymes protéolytiques, lequel complexe présente un poids moléculaire compris entre  $4,8.10^6$  et  $6,6.10^6$  ;

5 - soit de 12 bases de pentons, à l'exclusion de tout autre élément constitutif du génome d'un adénovirus, lesquelles bases de penton sont dérivées soit du même adénovirus, soit d'adénovirus différents, et forment une structure en dodécaèdre, stable aux enzymes protéolytiques et en ce qu'il présente un poids moléculaire compris entre  $3,2.10^6$  et  $4.10^6$ .

B. d'une séquence d'acide nucléique à transfacter et

15 C. d'un ligand entre le complexe protéique adénoviral et l'acide nucléique, tel que les peptides dont la partie N-terminale comprend la séquence en aminoacides N-terminales d'une fibre d'adénovirus de n'importe quel sérotype (zone d'attachement au complexe protéique adénoviral) et dont la partie C-terminale comprend une polylysine ou une polyarginine.

20 Les vecteurs de transfection décrits dans cette Demande permettent l'internalisation de la séquence nucléique à transfacter et augmentent la perméabilité des endosomes ; il s'agit toutefois d'une structure relativement complexe qui mime le comportement des adénovirus ; en effet, les particules d'adénovirus sont relativement complexes et comprennent 25 plusieurs sous-structures; en particulier la partie externe ou capsidé est formée majoritairement de trois protéines : l'hexon, la base du penton et la fibre ; la fibre permet l'attachement du virion à un récepteur cellulaire, alors que la base du penton permet l'internalisation du virion.

Poursuivant leurs recherches, les Inventeurs ont trouvé que 30 de manière inattendue, un peptide dérivé de la protéine de fibre d'adénovirus

est capable de transfecter, de manière efficace, des séquences d'acides nucléiques ou des protéines, en l'absence de liposomes et de traitement des cellules.

La présente invention a pour objet un vecteur peptidique de

5 transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'adénovirus et comportant au

10 moins une zone constituée d'au moins 50 % d'aminoacides hydrophobes sélectionnés dans le groupe constitué par lalanine, la valine, la phénylalanine, l'isoleucine, la leucine, la proline et la méthionine.

Conformément à l'invention, ledit peptide dérive d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur de transfection, ledit peptide de transfection comprend :

- un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes :  $X_0$ -Lys-Arg-Val-Arg ( $X_0$ KRVR) (SEQ ID NO:1),  $X_0$ -Lys-Arg-Ala-Arg ( $X_0$ KRAR) (SEQ ID NO:2),  $X_0$ -Lys-Arg-Ser-Arg ( $X_0$ KRSR) (SEQ ID NO:3),  ~~$X_0$ -Lys-Arg-Leu-Arg~~ ( $X_0$ -KRLR) (SEQ ID NO:4),  $X_0$ -Lys-Arg-Thr-Arg ( $X_0$ KRTR) (SEQ ID NO:5),  $X_0$ -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg ( $X_0$ PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles  $X_0$  est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes  $X_1$ -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-

Tyr-X<sub>2</sub> (X<sub>1</sub>FNPVYPYX<sub>2</sub>) (SEQ ID NO:7), X<sub>1</sub>-Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr-X<sub>2</sub> (X<sub>1</sub>FDPVYPYX<sub>2</sub>) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

X<sub>1</sub> est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des 5 aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp 10 (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X<sub>3</sub>-Glu-Asp-Asp (X<sub>3</sub>EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X<sub>3</sub> représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

X<sub>2</sub> est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des 15 aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser 20 (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) et - une séquence polymérique d'aminoacides basiques.

On entend par :

---

- ~~aminoacides hydrophobes, les aminoacides suivants : Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe et Met ;~~

25 - ~~aminoacides chargés acides, les aminoacides suivants : Asp et Glu ;~~

- ~~aminoacides chargés basiques, les aminoacides suivants : Lys, Arg et ornithine ; et~~

- ~~aminoacides polaires neutres, les aminoacides suivants : Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, His et Trp.~~

Lorsque la substance chimique est une séquence d'acide nucléique, elle est sélectionnée parmi les gènes qui codent pour un polypeptide présentant une activité thérapeutique, les séquences anti-sens et les ribozymes.

5 Dans le cas d'une séquence codante, elle comprend en outre un promoteur actif pour l'expression du polypeptide.

Ledit promoteur est notamment sélectionné dans le groupe constitué par des promoteurs constitutifs et des promoteurs inductibles.

10 De manière surprenante, un tel vecteur peptidique de transfection ne comprenant pas de lipides (sous forme de liposomes, par exemple), ni de base du penton est apte à transfacter, de manière efficace, notamment des séquences d'acide nucléique de n'importe quelle taille, jusqu'au noyau et ce s'en empoisonner la cellule transfectée.

15 Dans tous les cas, la séquence d'acide nucléique exogène, la protéine d'intérêt ou toute autre substance chimique, associée au dit vecteur de transfection pénètre dans la cellule (internalisation).

20 De manière surprenante, l'interaction peptide de transfection-récepteur cellulaire accroît, de manière significative, à la fois l'internalisation du vecteur de transfection et la perméabilité des endosomes, ce qui augmente, de manière significative, le passage de l'acide nucléique exogène, de la protéine d'intérêt ou de toute autre substance chimique des endosomes vers le cytoplasme et vers le noyau, en comparaison avec l'utilisation d'une vecteur incluant des lipides (sous la forme de liposomes, par exemple).

25 De tels vecteurs peptidiques de transfection se révèlent, de manière surprenante, plus efficaces et moins toxiques que des compositions contenant des liposomes (lipides cationiques ou lipofectants).

30 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, la séquence polymérique d'aminoacides basiques comprend entre 10 et 50 résidus d'aminoacides, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'arginine et l'ornithine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, la séquence NLS est à l'extrémité N-terminale du peptide de transfection et la séquence polymérique d'aminoacides basiques est à l'extrémité C-terminale dudit peptide de transfection.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, lorsque la substance chimique est un acide nucléique, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, il est associé à un ligand de ciblage.

15 L'invention a également pour objet une composition, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par un vecteur de transfert tel que défini ci-dessus et un véhicule convenable sélectionné dans le groupe constitué par les sels biliaires, les antiprotéases, les cyclodextrines et leurs dérivés, les antiseptiques et les polyols.

Les compositions selon l'invention ont de nombreuses applications comme médicaments, en médecine humaine et vétérinaire :

20 - en thérapie génique humaine et animale, notamment dans les maladies héréditaires,  
- comme agents antiviraux (séquences anti-sens ou ribozymes),

~~- comme agents immunogènes ou vaccinaux,~~

- comme agents antibactériens, anticancéreux etc...

25 La présente invention a également pour objet un procédé de transfection *in vitro* de cellules eucaryotes avec une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact et l'incubation 30 d'un vecteur peptidique de transfection conforme à l'invention, dans un

tampon de dilution comprenant du NaCl 100-150 mM avec des cellules eucaryotes pendant 15 à 120 minutes à température ambiante, le rapport substance chimique à transfacter : peptide de transfection étant compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

5 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

10 - la figure 1 illustre le transfert du gène de la luciférase avec le peptide I, en fonction du temps (figure 1A) ou en fonction de la concentration en NaCl (figure 1B).

15 - la figure 2 illustre la cinétique de l'expression du gène de luciférase ; cette figure comporte en abscisse les rapports peptide de transfection/ADN ou DOTAP/ADN et en ordonnées, le pourcentage de transfection à J1 (■), J2 (□), J3 (▨) et J6 (▢) ;

20 - la figure 3 représente les migrations obtenues sur un gel de retardement, en fonction de la quantité de peptide de transfection ;

25 - la figure 4 illustre les transfections obtenues avec les liposomes DOSPER et DOTAP ; cette figure comporte en abscisse les rapports liposomes/ADN et en ordonnées les RLU (*Related Light Unit*)/10sec/10<sup>5</sup> cellules ;

30 - la figure 5 illustre la cinétique d'entrée dans les cellules d'un peptide (peptide I), observée en microscopie confocale ; la colonne A montre le peptide fluorescent et la colonne B montre les acides nucléiques cellulaires colorés au iodure de propidium ;

35 - la figure 6 illustre l'inhibition de la transfection par le peptide I, après une préincubation avec un excès de peptide I. Les cellules HeLa dans des plaques comportant 24 puits sont préincubées avec le peptide I pendant une heure à 4°C à des concentrations de 10 ou 50 µg/ml, respectivement ;

- la figure 7 représente quelques séquences de fibres d'adénovirus.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne 5 constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : Matériel et méthodes.**

- Cellules, plasmide et peptides :

Les cellules HeLa sont cultivées à 37°C dans un milieu EMEM supplémenté en sérum de veau foetal à 10 % sous une atmosphère contenant 10 5 % de CO<sub>2</sub>.

Un vecteur reporter de la luciférase (plasmide pGL3, Promega), est utilisé pour démontrer la transfection.

Le peptide IC comprend la séquence n° 2, la séquence n° 10, la séquence n° 7, la séquence n° 16, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale et 10 lysines ; ce peptide correspond aux 20 résidus N-terminaux de la fibre d'Ad3. Le peptide I contient ces mêmes 20 aminoacides N-terminaux de la fibre d'Ad3 et 20 lysines ; les peptides ont été obtenus par synthèse en phase solide, suivie d'une purification par HPLC.

Ce peptide I est marqué à la fluorescéine ; des peptides 20 comprenant 10 lysines au lieu de 20, ont été également préparés. L'intégrité de l'ensemble des peptides est vérifiée par spectroscopie de masse.

- Gel de retardement :

500 ng d'ADN plasmidique (pGL3) sont préincubés avec différentes quantités de peptides pendant 5 min à température ambiante, puis 25 soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % préparé dans un tampon TBE.

Après électrophorèse à 50 V dans le tampon TBE pendant 30 min, l'ADN sur le gel étant coloré au bromure d'éthidium et visualisé en lumière ultraviolette.

- Transfections :

1,5 à 12 µg de peptide I dans 50 µl de tampon de dilution (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) sont incubés avec 1,5 µg de plasmide pGL3 dans 250 µl de milieu EMEM pendant 15 à 30 min à température ambiante.

5 Le mélange de DOTAP ou de DOSPER avec 1,5 µg de plasmide pGL3 est préparé selon les instructions du fabricant (Boehringer). Pour les études de l'effet du peptide sur la transfection en présence des liposomes, des portions de peptides sont mélangées avec le DOTAP ou le DOSPER dans le tampon de dilution défini plus haut pendant 15 à 30 min à  
10 température ambiante, puis 1,5 µg de plasmide pGL3 est ajouté et incubé 15 min à température ambiante.

15 Les transfections sont réalisées dans des plaques comportant 24 puits (Beckton Dickinson) avec  $1,5 \times 10^5$  cellules/puits (confluence d'environ 50 %) pendant 1 h à 37°C. Après 24 h, l'émission lumineuse est mesurée dans les lysats cellulaires avec le test Promega Luciferase Assay System.

- Test hémolytique :

20 Des érythrocytes humains sont lavés 3 fois avec du tampon PBS.  $10^6$  érythrocytes sont incubés avec 6 µg de peptide I pendant différentes périodes de temps à 37°C. Après centrifugation à 10 000 g pendant 5 min, la densité optique du surnageant est mesurée à 540 nm.

- Internalisation du peptide :

25 Des cellules HeLa, cultivées sur lamelles ( $10^5$  cellules/lamelle) sont traitées avec de la sérum albumine bovine à 3 % dans du EMEM pendant 15 min à 37°C.

30 Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS, incubées avec 40 µg/ml de peptide I marqué à la fluorescéine pendant différentes durées à 37°C, fixées avec du paraformaldéhyde à 2 % dans du PBS pendant 20 min à 37°C, lavées avec du PBS et colorées avec 1 µg/ml d'iodure de propidium dans du PBS pendant 5 min à température ambiante.

Les lamelles sont montées sur une lame de microscope avec du 1,4-diazabicyclooctane (Sigma) et observées sur un microscope confocal MRC600 (BioRad).

\* Résultats :

5 - Transfection cellulaire avec le peptide I :

Toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules HeLa transfectées par le plasmide pGL3 (Stratagene) portant le gène de la luciférase. Pour des rapports peptide I/ADN égaux à 2, le temps optimal d'interaction entre les complexes transfectants et les cellules est compris entre 10 60 et 120 min (figure 1A).

L'effet des concentrations de NaCl a été testé pendant 1 h de transfection sur l'expression génique mesurée 24 h après la transfection (figure 1B).

Il existe un optimum de transfection pour des rapports 15 peptide I/ADN compris entre 4 et 6 et pour une concentration en NaCl de 125 mM. Les concentrations inférieures à 100 mM et supérieures à 150 mM semblent inhibitrices.

20 L'expression du transgène peut être observée jusqu'à 6 jours après la transfection (figure 2). Cependant, l'addition de sérum à 2 % abolit complètement la transfection avec le peptide I.

Le comportement des complexes ADN/peptide est analysé sur des gels à retardement. Théoriquement, 526 molécules de peptide sont nécessaires pour neutraliser les charges de phosphate portées par le plasmide (5256 pb), ce qui signifie que 322 ng de peptide I sont nécessaires pour la 25 neutralisation complète de 500 ng de plasmide.

La figure 3 montre que l'incubation avec 250 ng de peptide entraîne un retardement de la migration de l'ADN et l'addition de 500 ng de peptide stoppe complètement sa migration, ce qui est en accord avec les considérations théoriques exposées ci-dessus.

L'efficacité de transfection la plus importante est observée lorsque l'on a un excès de l'ordre de 4, de charges neutralisantes peptidiques par rapport à l'ADN (figure 1B), ce qui confirme que le transfert du gène n'intervient qu'en présence d'un excès de charges positives.

5 - Paramètres intervenant sur l'efficacité de la transfection par le peptide selon l'invention :

Les peptides selon l'invention comprennent essentiellement 3 domaines, le signal de localisation nucléaire, le domaine hydrophobe et le polymère basique.

10 Pour étudier l'effet de la structure du peptide sur la transfection d'ADN, une série de peptides dans lesquels les différentes parties du peptide I ont été éliminées, dont les séquences sont illustrées au Tableau I ci-après :

TABLEAU I

Peptide	Séquences*
I	<b>A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K<sub>20</sub></b> = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K <sub>20</sub>
IC	<b>A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K<sub>10</sub></b> = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K <sub>10</sub>
IE	<b>A K R A R L S T S E D E S - K<sub>10</sub></b> = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K <sub>10</sub>
ID	<b>A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K<sub>20</sub></b> = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K <sub>20</sub>
IA	<b>A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S</b> = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16

15 \* dans lesquelles X<sub>0</sub> = A.

Les résultats obtenus avec ces différents peptides sont illustrés au Tableau II ci-après.

TABLEAU II

Peptide (μg)	ADN (μg)	RLU/10 s/10 <sup>5</sup> cellules x 10 <sup>3</sup>
<u>Peptide I</u>		
3	1,5	450
6	1,5	4 920
9	1,5	1 450
12	1,5	1 170
<u>Peptide IC</u>		
3,6	1,5	1
9	1,5	2 870
12	1,5	1 330
<u>Peptide IE</u>		
3	1,5	1
6	1,5	10
9	1,5	110
12	1,5	330
<u>Peptide ID</u>		
3-12	1,5	1
<u>Peptide IA</u>		
3-12	1,5	1
<u>Peptide K<sub>10</sub></u>		
3-12	1,5	1
<u>Peptide K<sub>20</sub></u>		
3-12	1,5	1-10

Les résultats présentés dans le Tableau II montrent que l'efficacité de transfection dépend de la présence de la séquence signal de 5 localisation nucléaire de la protéine de fibre d'adénovirus.

Il n'y a aucune transfection lorsque l'on retire le domaine NLS (peptide 1D), la polylysine (peptide 1A) ou à la fois le domaine NLS et la zone hydrophobe (peptide K<sub>10</sub> et peptide K<sub>20</sub>). L'élimination du domaine hydrophobe entre la partie NLS et la partie polylysine induit un effet significatif : ce 10 peptide (peptide IE) est environ 30 fois moins efficace que le peptide IC. Même si le peptide 1D est encore capable d'attacher et de condenser l'ADN et d'entrer dans la cellule, il semble cependant incapable de transporter cet ADN dans le noyau.

Il ressort également de ces résultats que lorsque l'on diminue 15 le nombre de lysines présent dans le polymère polylysine (peptide IC), on

observe un modeste effet négatif sur l'efficacité de transfection qui peut être contrebalancé en augmentant la quantité de peptide nécessaire pour un transfert efficace.

5 - Effet du peptide sur la transfection en présence de liposomes :

Deux liposomes ont été utilisés, le liposome DOTAP et le liposome DOSPER, tous deux commercialisés par Boehringer.

Ils sont constitués de lipides cationiques avec des liaisons esters internes capables d'être dégradées par les estérases ou les lipases cellulaires, ce qui devrait conférer à ces liposomes une cytotoxicité inférieure à celle observée avec d'autres liposomes.

Les conditions de transfection des cellules HeLa ont été optimisées pour les liposomes seuls (figure 4). La transfection avec le liposome DOTAP conduit à des efficacités inférieures à celles observées avec le liposome DOSPER ; cependant, les transfections avec le liposome DOTAP ont tendance à présenter un plateau au dessus d'un certain rapport ADN/liposome, tandis que les transfections avec le liposome DOSPER présentent un pic. Pour les transfections simultanées peptide/liposome, l'ordre dans lequel ces composés sont ajoutés est important, puisque l'on observe une efficacité supérieure (augmentation de plusieurs facteurs), lorsque le liposome est d'abord mélangé avec le peptide (et non avec l'ADN) puis lorsque l'ADN plasmidique est ajouté après 15 min d'incubation à température ambiante.

---

Le Tableau III ci-après illustre les résultats obtenus.

**TABLEAU III**RLU/10 sec/10<sup>5</sup> cellules x 10<sup>3</sup>

DOTAP:ADN	Pas de peptide I	Peptide I:ADN		
2	9 320 ± 820	2	4	
4	18 590 ± 570	28 900 ± 890	30 440 ± 2 360	
6	4 140 ± 640	15 050 ± 340	17 750 ± 750	
DOSPER:ADN			Peptide I:ADN	
4	822 ± 78	1	2	4
5,5	6 880	3 160 ± 760	11 102 ± 2 370	5 140
		18 820	13 760	12 840
Pas de liposome			13 550 ± 2 930	35 500 ± 4 800

Les résultats illustrés à ce Tableau III ont été obtenus dans les conditions suivantes :

5 des portions du peptide I sont mélangées avec 1,5 µg de plasmide pGL3 dans 300 µl de tampon de dilution pendant 15 min à température ambiante.

Le liposome DOTAP est mélangé avec 1,5 µg de plasmide pGL3 dans un rapport DOTAP/ADN de 2 ou de 4 (v/p), dans 300 µl de 10 tampon de dilution pendant 15 min à température ambiante.

De manière surprenante, ces résultats montrent qu'en l'absence de liposomes, on observe avec le peptide seul dans des rapports peptide/ADN de 4, des résultats supérieurs à ceux observés avec le mélange liposome/peptide.

15 - Localisation intracellulaire du peptide :

La distribution cellulaire du peptide I fluorescent est suivie en microscopie confocale (figure 5).

Les premières observations, effectuées 2 min après la transfection, montrent une certaine quantité de signal à la périphérie de la cellule.

20 5 à 10 min après l'addition du peptide, on observe un signal cytoplasmique fort, indiquant l'entrée du peptide dans la cellule.

A 30 min, le signal est également observé dans le noyau et un signal très brillant est observé dans les nucléoles. Ce transfert important vers les nucléoles est particulièrement surprenant.

Les observations réalisées entre 60 et 120 min montrent le 5 passage du peptide à nouveau dans le cytoplasme et à la périphérie de la cellule jusqu'à la perte totale du signal.

Les résultats illustrés à cette figure 4 ont été obtenus avec des concentrations en peptide deux fois plus importantes (40 µg/ml) que celles utilisées pour les essais de transfection d'ADN. Lorsque l'on utilise les 10 concentrations habituelles pour les transfctions, l'accumulation de peptides est plus lente, mais suit les mêmes étapes que celles précisées ci-dessus.

- Mécanisme de l'internalisation du peptide :

Un test hémolytique réalisé avec le peptide I sur des érythrocytes donne des résultats négatifs qui montrent que l'interaction de la cellule 15 avec le peptide I n'est pas liée à la formation de pores. Dans la mesure où l'on observe aucune expression de luciférase lorsque les transfctions sont réalisées à 4°C, il semble que le mécanisme de l'internalisation du peptide dépend de l'endocytose et implique le cytosquelette.

Pour déterminer s'il existe des sites d'attachement spécifique 20 du peptide I à la membrane plasmique, des cellules ont été préincubées avec le peptide I à 4°C pendant 2 h, de manière à essayer de saturer les éventuels sites d'attachement du peptide.

~~Il en est résulté une inhibition totale de la transfection (figure 6), qui indique que cette dernière implique une endocytose récepteur dépendante.~~

- Taille du complexe transfectant :

On peut utiliser la dispersion de la lumière pour mesurer la taille des complexes et leur distribution, s'il y a une formation de population mixte. Dans ces conditions, on peut étudier l'effet du temps d'incubation sur 30 la formation des complexes transfectants.

La taille est mesurée immédiatement après le mélange et 1 h après. Les complexes réalisés par mélange du liposome DOTAP avec un plasmide d'ADN ont un diamètre d'environ 115 nm et leur taille ne change pas pendant l'incubation.

5 Les complexes ADN/peptide I sont plus grands et présentent un diamètre d'environ 350-360 nm. De plus, la formation du complexe est un processus dynamique puisque l'on observe une augmentation rapide de la taille en fonction du temps d'incubation lorsque plus de 90 % des complexes atteint un diamètre 660-1100 nm après 1 h.

10 La taille et la distribution des complexes avec le peptide I est similaire quel que soit le rapport peptide/ADN (de 1 à 8).

15 L'effet de la taille du complexe sur l'efficacité de la transfection a été étudié en utilisant des complexes préparés en faisant varier la période d'incubation à température ambiante. Les résultats sont illustrés au Tableau IV ci-après.

**TABLEAU IV**

RLU/10 sec/10<sup>5</sup> cellules x 10<sup>3</sup>

Peptide:ADN	Temps de préincubation à température ambiante (min)			
<u>Expérimentation 1 :</u>	15	60	120	
2	410	150	827	
4	2 540	1 900	1 460	
6	702	3 460	980	
<u>Expérimentation 2 :</u>	0	15	30	60
4	400	3 240	4 950	4 120
<u>Expérimentation 3 :</u>	0	15	30	60
4	1 710	14 550	23 170	32 175
				6 800

20 De manière surprenante, avec les complexes selon l'invention, même de très grands agrégats peuvent être transfectés.

Pour mesurer la taille de la substance transfectée, des mesures de dispersion de la lumière ont été réalisées avec un laser ion-argon (Spectra Physics 1161) à 488 nm et 150 mW (géométrie de dispersion à 90°). Le spectre est accumulé pendant 200 s en utilisant un corrélateur Malvern 7032 (Malvern

Instruments) puis répété 1 h après. Tous les spectres sont en mode homodyne : les amplitudes de la fonction de corrélation d'intensité avec un retard nul sont consistantes avec le facteur de cohérence spécial  $\beta$  obtenu avec une suspension de latex dilué, à savoir  $\beta = 0,90$ .

5 Les rayons hydrodynamiques  $R_H$  sont calculés en utilisant la procédure multimodale Malvern (Pike-Ostrowsky), pour caractériser les principaux taux de dégradation de la fonction de corrélation de champs avec la relation de Stokes-Einstein  $R_H = k_B T Q^2 / (6\pi\eta\Gamma_1)$ , dans laquelle  $\Gamma_1$  est le taux de dégradation principale,  $T$  est la température absolue du bain thermique  
10 (298 K),  $Q$  le vecteur d'onde de transfert et  $\eta$  la viscosité du solvant.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du  
15 technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.



### REVENDICATIONS

1°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmaco-5 logiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'adénovirus et comportant au moins une zone constituée d'au moins 50 % d'aminoacides hydrophobes sélectionnés dans le groupe constitué par l'alanine, la valine, la phénylalanine, l'isoleucine, la leucine, la proline et 10 la méthionine.

2°) Vecteur de transfection selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide de transfection dérive en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 15 (CELO) et FAV7.

3°) Vecteur de transfection selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ledit peptide de transfection comprend :  
 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence 20 sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes :  $X_0$ -Lys-Arg-Val-Arg ( $X_0$ KRVR) (SEQ ID NO:1),  $X_0$ -Lys-Arg-Ala-Arg ( $X_0$ KRAR) (SEQ ID NO:2),  $X_0$ -Lys-Arg-Ser-Arg ( $X_0$ KRSR) (SEQ ID NO:3),  $X_0$ -Lys-Arg-Leu-Arg ( $X_0$ KRLR) (SEQ ID NO:4),  ~~$X_0$  Lys Arg Thr Arg ( $X_0$ KRTR) (SEQ ID NO:5)~~,  $X_0$ - 25 Pro-Lys-Lys-Pro-Arg ( $X_0$ PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles  $X_0$  est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes  $X_1$ -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- $X_2$  ( $X_1$ FNPVYPY $X_2$ ) (SEQ ID NO:7),  $X_1$ -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- $X_2$  30 ( $X_1$ FDPVYPY $X_2$ ) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

$X_1$  est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou  $X_3$ -Glu-Asp-Asp ( $X_3$ EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle  $X_3$  représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

$X_2$  est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) et - une séquence polymérique d'aminoacides basiques.

4°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence polymérique d'aminoacides basiques comprend entre 10 et 50 résidus d'aminoacides, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'arginine et l'ornithine.

5°) Vecteur de transfection selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce que la séquence NLS est à l'extrémité N-terminale du peptide de transfection et la séquence polymérique d'aminoacides basiques est à l'extrémité C-terminale dudit peptide de transfection.

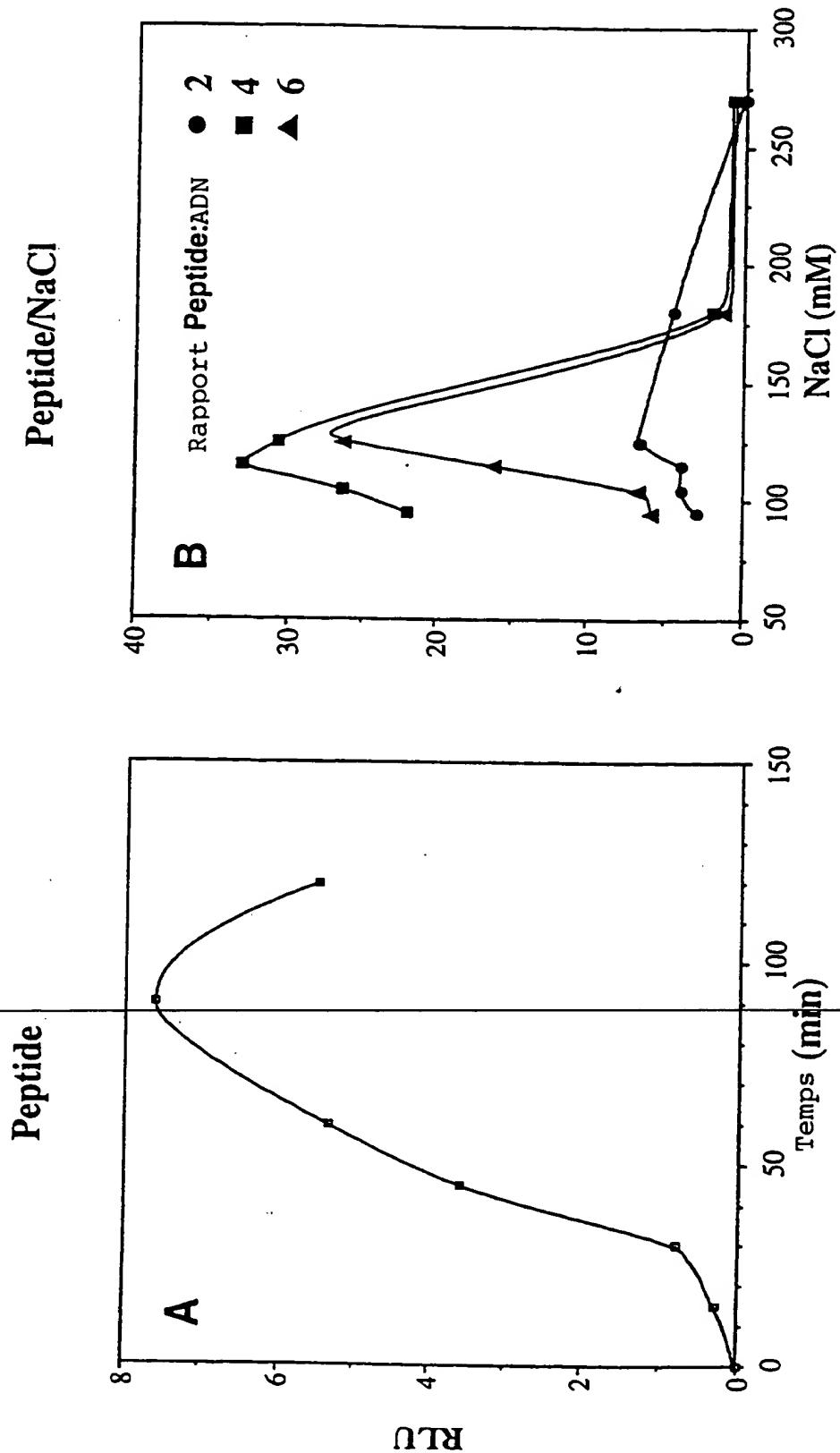
6°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lorsque la substance chimique est un

acide nucléique, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

7°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est associé à un ligand de ciblage.

8°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et un véhicule convenable sélectionné dans le groupe constitué par les sels biliaires, les antiprotéases, les cyclodextrines et leurs dérivés, les antiseptiques et les polyols.

9°) Procédé de transfection *in vitro* de cellules eucaryotes avec une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact et l'incubation d'un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans un tampon de dilution comprenant du NaCl 100-150 mM avec des cellules eucaryotes pendant 15 à 120 minutes à température ambiante, le rapport substance chimique à transfacter sur peptide de transfection étant compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

**FIGURE 1**

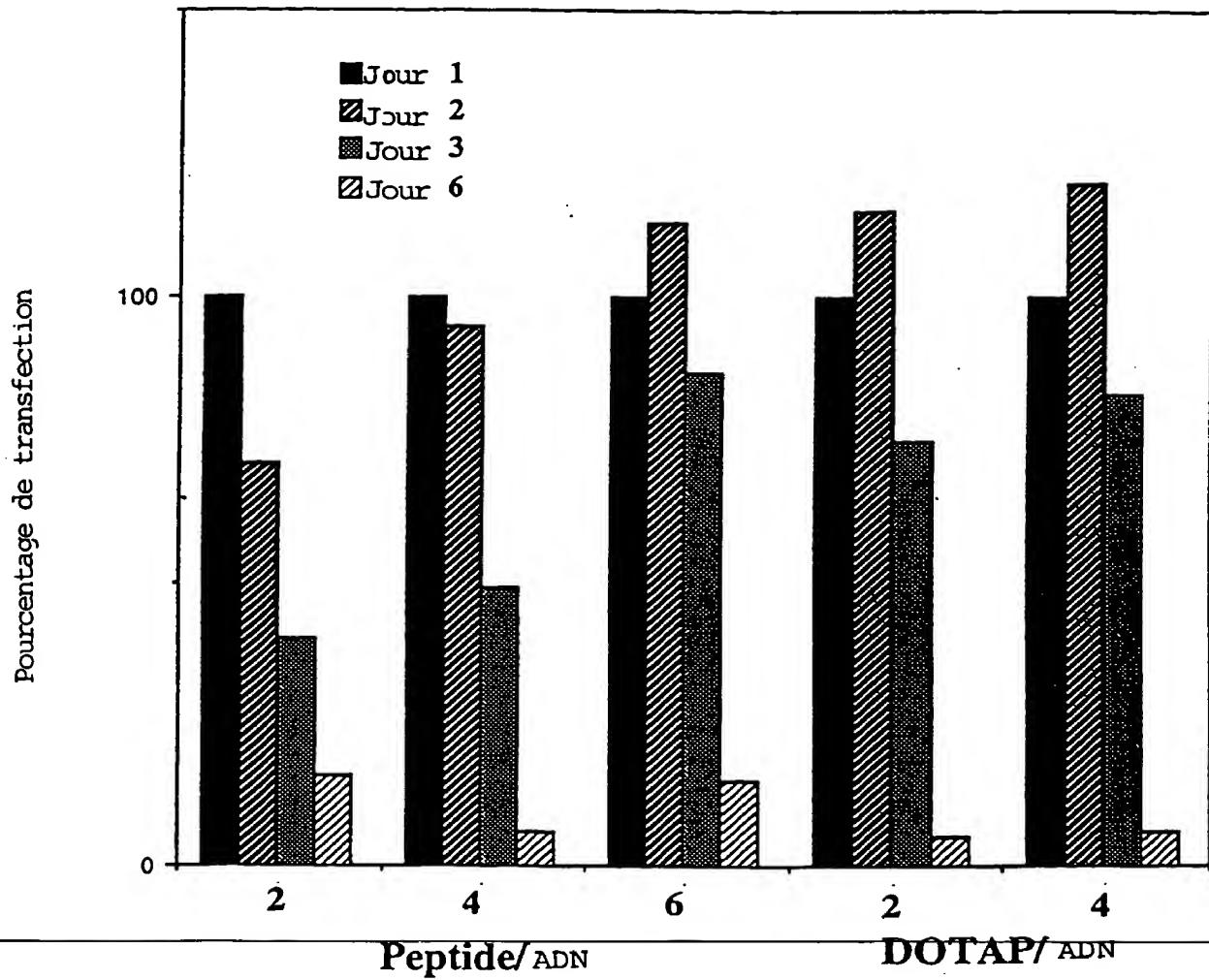


FIGURE 2

3/7

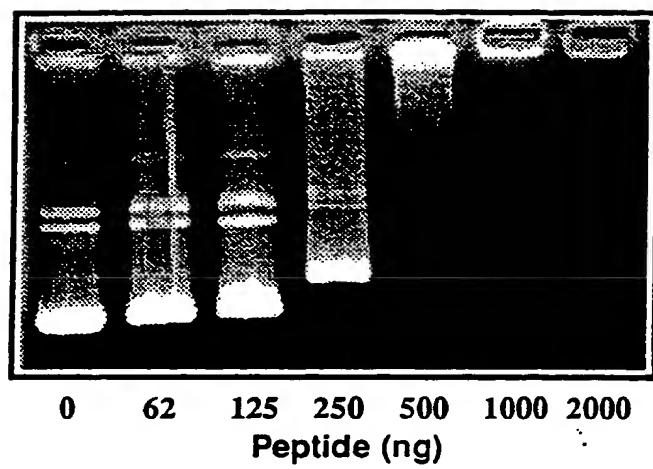


FIGURE 3

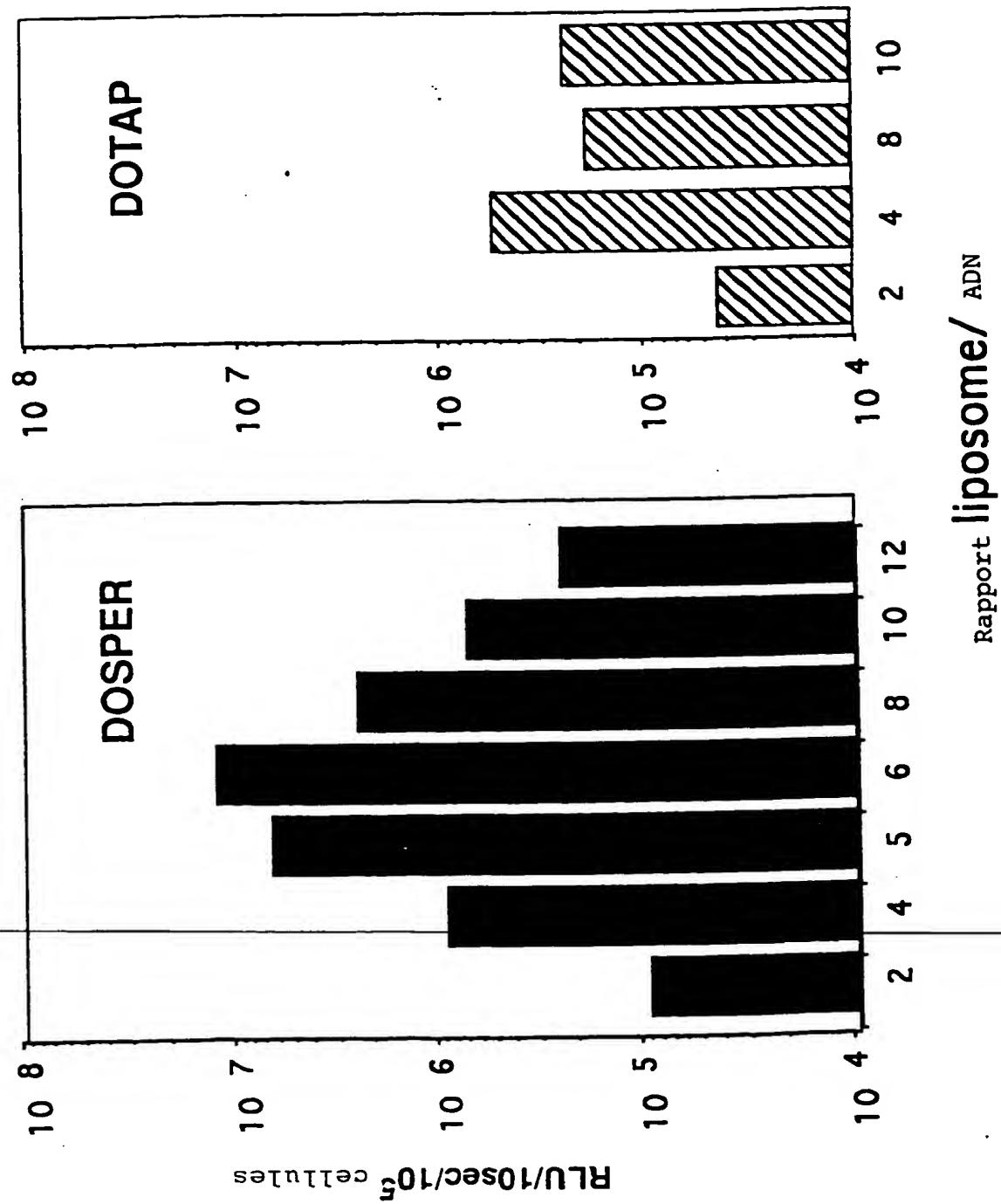


FIGURE 4

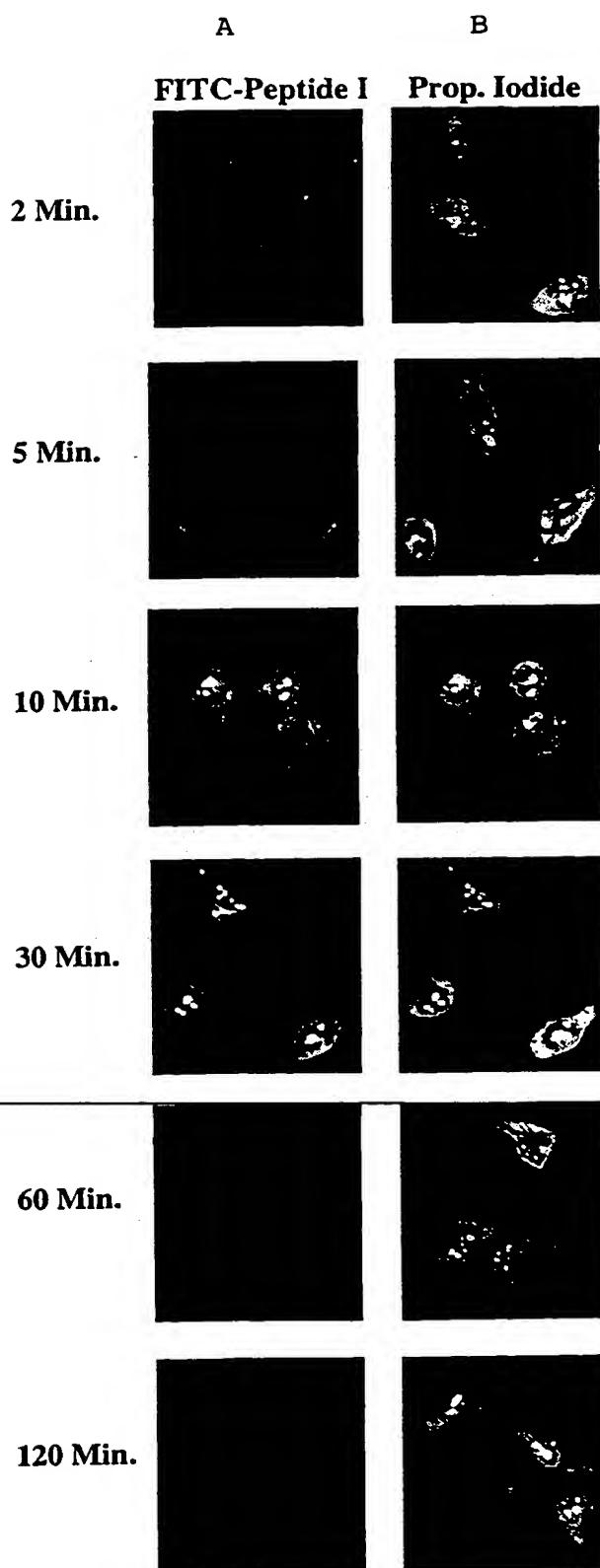


FIGURE 5

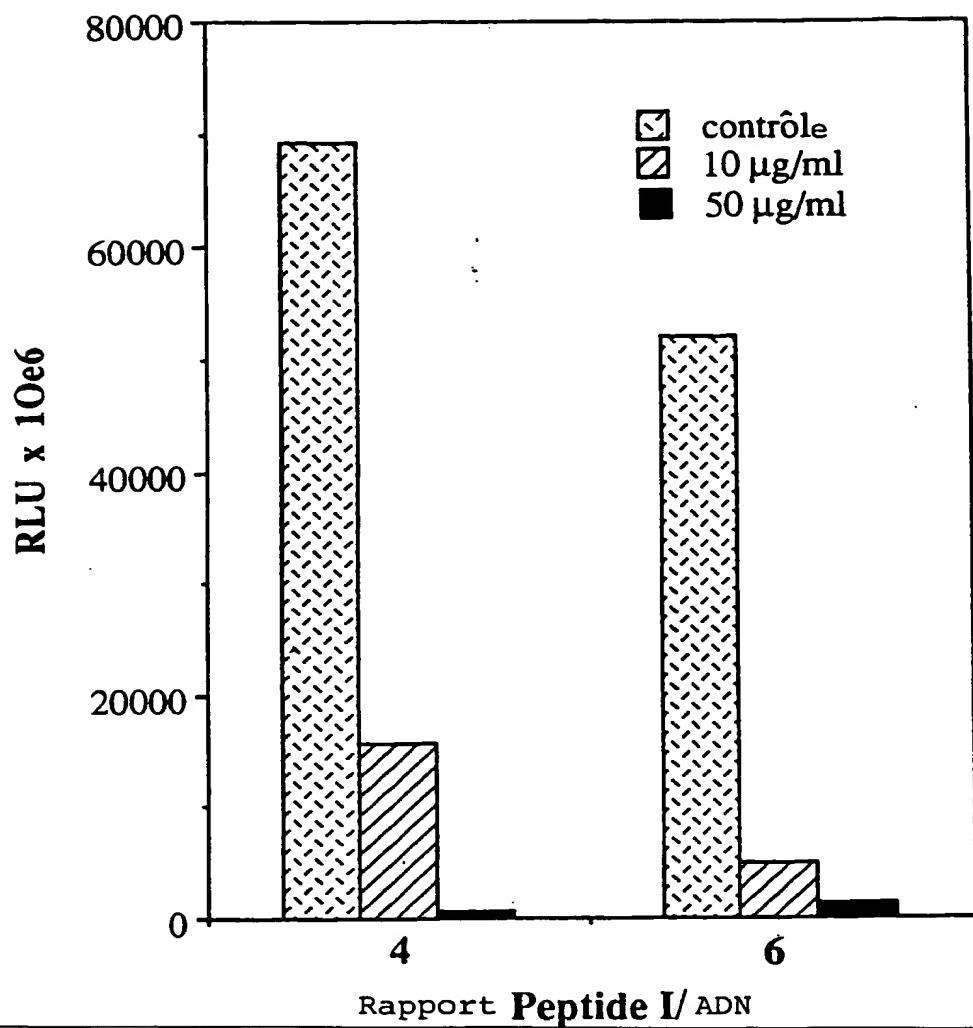


FIGURE 6

AD11p	1	MT - <b>K</b> RVRL S - - -	- DSF N P V Y P Y E D E S T S Q - -	- H P F I N P G F
AD11a	1	MT - <b>K</b> RVRL S - - -	- DSF N P V Y P Y E D E S T S Q - -	- H P F I N P G F
AD7	1	MT - <b>K</b> RVRL S - - -	- DSF N P V Y P Y E D E S T S Q - -	- H P F I N P G F
AD21	1	MT - <b>K</b> RVRL S - - -	- DSF N P V Y P Y E D E S T S Q - -	- H P F I N P G F
AD3	1	WA - <b>K</b> RA RL S - - -	- TSF N P V Y P Y E D E S S S Q - -	- H P F I N P G F
AD16	1	WA - <b>K</b> RA RL S - - -	- SSF N P V Y P Y E D E S S S Q - -	- H P F I N P G F
AD2	1	W - <b>K</b> RA RP S - - -	- EDT F N P V Y P Y D T E T G P P T -	- V P F L T P P F
AD5	1	W - <b>K</b> RA RP S - - -	- EDT F N P V Y P Y D T E T G P P T -	- V P F L T P P F
AD4	1	W S K <b>K</b> RA RV - - -	- DDG F D P V Y P Y D A D N A - P T -	- V P F I N P P F
AD12	1	W - <b>K</b> RS RT Q Y A E E T E E N D D F N P V Y P F D P F D T S D -	- EDD F N P V Y P Y G Y A R N Q N - -	- I P F L T P P F
AD8	1	MT - <b>K</b> R RA - - -	- EDD F N P V Y P Y G Y A R N Q N - -	- I P F L T P P F
AD9	1	MS - <b>K</b> R RV - - -	- EDD F N P V Y P Y E H Y N - P L D -	- I P F L T P P F
AD15	1	MS - <b>K</b> R RV - - -	- EDD F N P V Y P Y E H Y N - P L D -	- I P F L T P P F
AD41-1	1	M - <b>K</b> RA RL - - -	- EDD F N P V Y P Y E H Y N - P L D -	- I P F L T P P F
AD40-1	1	M - <b>K</b> RA RF - - -	- EDD F N P V Y P Y E H Y N - P L D -	- I P F L T P P F
AD40-2	1	M - <b>K</b> RT RI - - -	- EDD F N P V Y P Y D T S S - T P S -	- I P Y V A P P F
AD41-2	1	M - <b>K</b> RT RI - - -	- EDD F N P V Y P Y D T F S - T P S -	- I P Y V A P P F

**FIGURE 7**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**